DOI:10.11931/guihaia.gxzw201912007

滇龙胆 *GrHDR* 基因的克隆与表达分析

杜波[1,2]，蔡传涛[1*]，张霁[1,2,3]

（1.中国科学院西双版纳热带植物园，昆明 650221；2.中国科学院大学，北京 石景山 100049；3.云南省农业科学院药用植物研究所，昆明 650200）

摘 要：龙胆苦苷（gentiopicroside）是中药龙胆中的主要药效成分，属于萜类化合物的衍生物。1-羟基-2-甲基-2-（*E*）-丁烯基-4-二磷酸还原酶（1-hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-diphosphate reductase），HDR 是萜类物质合成途径中的关键酶。为探讨不同光照条件下滇龙胆 *HDR*（*GrHDR*）基因的表达与龙胆苦苷含量之间的关系，以滇龙胆叶片 cDNA 为模板，采用 PCR 和 TA 克隆技术获得 *GrHDR* 基因序列，对该序列进行生物信息学分析和表达分析，并采用高效液相色谱法测定龙胆苦苷含量，对该基因表达与龙胆苦苷含量进行比较。结果表明：*GrHDR* 基因（GenBank 登录号： KJ917165.1）全长 1 398 bp，编码 465 个氨基酸，推定 GrHDR 蛋白是亲水且稳定的，相对分子质量是 52 281.25 Da，理论等电点是 5.32；该蛋白属于 LYTB 蛋白家族，可能定位于叶绿体上，无信号肽，二级结构主要由α-螺旋（45.16%），β-转角（6.24%）、无规卷曲（33.98%）、延伸链（14.62%）构成；GrHDR 蛋白序列与同属植物秦艽的 HDR 蛋白相似性最高（95.71%）；实时荧光定量 PCR 结果显示 *GrHDR* 基因在滇龙胆中的表达量为：根 ＞ 叶 ＞ 茎，而在 10%、30%、100%全光光照条件下各组织的表达量有很大差异；高效液相色谱法结果显示，不同光照条件下龙胆苦苷含量一致，均为：根 ＞ 叶 ＞ 茎，其中 100%全光光照下，药用部位根中龙胆苦苷含量达到 7.141%，约是 30%、10%全光光照条件的两倍，但该结果与同一光照条件下 *GrHDR* 基因表达规律不完全一致。本研究为阐述 *HDR* 基因功能及其与龙胆苦苷含量的关系提供参考。

关键词：滇龙胆，*GrHDR* 基因，序列分析，组织表达分析，龙胆苦苷含量

Cloning and expression analysis of *GrHDR* gene in *Gentiana rigescens*

DU Bo[1,2], CAI Chuantao[1*], ZHANG Ji[1,2,3]

(1. *Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650221, China; 2. *University of Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100049, China; 3. *Medicinal Plants Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences*, Kunming 650200, China)

Abstract: Gentiopicroside, a derivative of terpenoids, is the main medicinal ingredient in traditional Chinese medicine “Long Dan”. 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphate reductase (HDR) is a key enzyme in the synthesis of terpenoids. In order to explore the relationship between the expression of *HDR* (*GrHDR*) gene and content of gentiopicroside under different light conditions, the cDNA from the leaves of *Gentiana rigescens* was used as template, the *GrHDR* gene sequence was obtained by PCR and TA cloning technology, and then bioinformatics analysis and tissue expression analysis were carried out. Finally, high performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the content of gentiopicroside, and the expression of *GrHDR* gene were compared to the content of gentiopicroside. The results showed that the *GrHDR* gene (GenBank accession number: KJ917165.1) is 1 398 bp in length and

基金项目：国家自然科学基金项目（81760684）；中国科学院西双版纳热带植物园“一三五”重点培育项目（2017XTBG-F05）[Supported by the National Natural Science Foundation of China(81760684); Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences "135 program" (2017XTBG-F05)]。

作者简介：杜波（1994-），女（白族），云南大理，硕士，研究方向为药用植物栽培，（E-mail） dubo@xtbg.ac.cn。

***通信作者：**蔡传涛，研究员，博士生导师，研究方向为药用植物栽培，（E-mail） caict@xtbg.ac.cn。

encodes 465 amino acids, its putative protein is hydrophilic and stable, the relative molecular mass is 52 281.25 Da, and the theoretical isoelectric point is 5.32. The putative protein that belongs to the LYTB protein family may be located on the chloroplast and has no signal peptide, and its secondary structure is mainly composed of α-helix (45.16%), β-turn (6.24%), random coil (33.98%), and extended chain (14.62%). The GrHDR protein sequence has the highest similarity to the HDR protein of the *G. macrophylla* (95.71%). The results of real-time PCR showed that the expression levels of *GrHDR* gene in *G. rigescens* were in the following order: root > leaf > stem, its tissue expressions were significantly different under the condition of 10%, 30% and 100% of full-light. The results of HPLC showed that the content of gentiopicroside under different light conditions were the same as follows: root > leaf > stem; among them, the content of gentiopicroside in root (7.141%) under 100% of full light, which was about twice that of 30% and 10% of full light, but the results are not completely consistent with the *GrHDR* gene expression pattern under the same light condition. This study provides references for explaining the function of *HDR* gene and its relationship with gentiopicroside.

Key words: *Gentiana rigescens*, *GrHDR* gene, sequence analysis, tissue expression analysis, gentiopicroside

滇龙胆（*Gentiana rigescens* Franch. ex Hemsl.），亦称“坚龙胆”，是龙胆科龙胆属多年生草本植物，也是我国中药材龙胆的基源植物之一（中国药典，2015）。主要分布于云南、四川、广西、贵州等地的林下、灌丛、草甸中（中国植物志，1988）。以干燥根和根茎入药，主要药效成分是环烯醚萜类的龙胆苦苷，主治清热燥湿，泻肝胆火（中国药典，2015）。近年来，由于人类无序采挖等原因，滇龙胆野生资源急剧减少，现已被《国家重点保护野生药材物种名录》列为国家三级保护野生药材物种（中国濒危物种科学委员会，2012）。开展滇龙胆人工栽培措施研究，提高药效成分含量，可以缓解野生资源压力。要提高其龙胆苦苷含量，必须弄清龙胆苦苷生物合成途径及调控机制，并明确影响龙胆苦苷含量的相关因素。

龙胆苦苷属于环稀醚萜类物质(Yang et al.，2003)，该类物质的合成分为三个阶段：第一阶段是通过质体甲基赤藓糖醇磷酸酯（MEP）途径和胞质甲羟戊酸（MVA）途径最终合成异戊烯二磷酸（IPP）和二甲基烯丙基焦磷酸（DMAPP）(El-Sayed & Verpoorte，2007；Kim et al.，2009)，而 IPP 和 DMAPP 是萜类化合物生物合成途径中的必需前体；第二阶段是 IPP 和 DMAPP 经过一系列反应形成断马钱子苷(Miettinen et al.，2014)，第三阶段是萜类化合物的碳骨架结构在酶的催化下进行一系列复杂的修饰，形成结构稳定的萜类化合物(张晓东等，2019)。本研究克隆了第一阶段 MEP 途径中最后一个关键酶，即 1-羟基-2-甲基-2-（*E*）-丁烯基-4-二磷酸还原酶（HDR），其能够将 HMBPP（甲基丁烯基-4-焦磷酸）转化为 IPP 或 DMAPP(Peng et al.，2011)。目前，*HDR* 基因已从拟南芥(Botella-Pavía et al.，2004)、蛇足石杉(Lv et al.，2015)、文心兰(Huang et al.，2009)、秦艽（*Gentiana macrophylla*）、青蒿(Peng et al.，2011)等多种植物中分离。且 *HDR* 基因的表达被证明与拟南芥幼苗期类胡萝卜素的产生(Botella-Pavía et al.，2004)、银杏中银杏内酯含量（张雯，2008）、喜树中喜树碱的合成(Wang et al.，2008)等相关。*HDR* 基因已成为萜类物质代谢过程中的理想靶点，其序列结构、生物学功能、表达调控等日益受到关注（岑文等，2015）。在龙胆苦苷作为主要有效成分的滇龙胆中，*HDR* 基因的研究尚未见到相关报道。

光照与药用植物的生长发育及次生代谢产物积累密切相关。研究表明遮荫是影响白及次生代谢产物的主要因子，适合白及生长的最佳遮荫度为 60%（张长煜，2018）。而 70%左右的遮荫有利于七叶一枝花的药效成分积累（梁娟等，2016）。关于遮荫对滇龙胆基因表达量以及龙胆苦苷含量的影响尚未见报道。本研究根据滇龙胆的转录组中 *HDR* 基因序列设计特异性引物，通过 RT-PCR 技术从一年生滇龙胆的幼叶中扩增到 *GrHDR* 基因，并进行 TA 克

隆、测序与序列分析；在三个水平的光照条件下通过荧光定量进行 *GrHDR* 基因的表达分析以及通过高效液相色谱法测定龙胆苦苷含量的变化，为明确滇龙胆龙胆苦苷合成途径的代谢过程提供依据，以及为 *HDR* 基因的功能及其与龙胆苦苷的关系等研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

滇龙胆植株栽培于云南省临沧市永德县荷泥塘乡（海拔 1 822.3 m，99° 25′ 46″ E，23° 54′ 13″ N）。基因克隆所用材料为新鲜的一年生滇龙胆植株，取样日期为 2019 年 5 月 9 日（注：2018 年 5 月 8 日播种，故为一年生植株）。组织特异性表达分析所用材料为不同遮荫处理下（注：于 2018 年 8 月 31 日布置遮荫网，分为全光、一层遮荫、二层遮荫 3 种遮荫处理）的盆栽植株，取样日期为 2019 年 9 月 1 日。取样时均选取植株中部分根、茎、叶，然后立即放入液氮罐中冷冻，带回实验室置于-80 ℃冰箱中保存备用。龙胆苦苷含量测定所用材料为组织表达分析所选植株的剩余部分根、茎、叶。

1.2 *GrHDR* 基因序列的克隆与表达分析

1.2.1 滇龙胆总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

根据植物总 RNA 提取试剂盒（TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit，购自 TaKaRa 公司，生产批号：AIF2395A）说明书提取幼叶总 RNA，按照逆转录试剂盒 RT6 cDNA Synthesis Kit（购自 TSINGKE 公司）说明书合成 cDNA。

1.2.2 滇龙胆 *GrHDR* 基因的 TA 克隆

根据滇龙胆转录组(Zhang et al.，2015)中 *GrHDR* 基因序列设计一对特异性引物（表 1）。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，反应体系为：2 × High-Fidelity Master Mix 25 μL，正反向引物各 2 μL，cDNA 模板 2 μL，加 ddH_2O 补足至 50 μL。PCR 扩增程序为：98 ℃预变性 2 min，1 个循环；98 ℃变性 10 s，60 ℃退火 15 s，72 ℃延伸 20 s，35 个循环；72 ℃延伸 2 min，1 个循环。PCR 产物经 1%（w/v）琼脂糖凝胶电泳检测，经过目的片段回收、纯化后连接到 pClone007 Simple 载体（购自 TSINGKE 公司，生产批号：TSV-007S）。转化到 DH5a 大肠杆菌感受态细胞（购自 TSINGKE 公司，生产批号：TSV-A07），摇菌培养过夜，PCR 检测为阳性克隆后进行 DNA 测序。

表 1 *GrHDR* 基因扩增所用引物

Table 1 Primers required for amplification of cDNA

引物名称 Primer name	引物序列（5’-3’） Primer sequence
HDR-CDS-F	ATGGCAATCTCTTTGCAATTCG
HDR-CDS-R	TTATGCCAGTTGCAAGGCTTC

1.2.3 *GrHDR* 基因的生物信息学分析

使用 NCBI 在线分析软件 ORFfinder 将 *GrHDR* 基因翻译成蛋白质序列，并使用其他在线生物信息学工具预测和分析 GrHDR 蛋白质的理化性质、结构域、二级结构、信号肽、转运肽，亚细胞定位信号以及三维结构模型等，并使用 DNAMAN 5.2.2 软件进行序列比对，然后使用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树。所用工具如表 2 所列。

表 2 生物信息学分析所用工具

Table 2　Tools for bioinformatics analysis

项目 Item	软件 Software	网址 Website
开放阅读框预测 ORF prediction	ORF finder	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/
蛋白理化性质预测 Protein physicochemical properties prediction	Protparam	https://web.expasy.org/protparam/
二级结构预测 Secondary structure prediction	Sopma	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html
结构域预测 Domain prediction	Pfam	http://pfam.xfam.org/search
信号肽预测 Signal peptide prediction	SignalP	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
转运肽预测 Transit peptide prediction	ChloroP	http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/
亚细胞定位预测 Subcellular localization prediction	Predict Protein	https://www.predictprotein.org/
	Softberry	http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=protcomppl&group=programs&subgroup=proloc
三级结构预测 Tertiary Protein Structure prediction	Swissmodel	https://swissmodel.expasy.org/interactive
跨膜结构域预测 Transmembrane domain prediction	TMHMM	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/

1.2.4 不同组织中 *GrHDR* 基因的表达分析

分别取一年生滇龙胆的根、茎、叶，提取总 RNA，反转录成 cDNA 作为 qPCR 的模板，采用 *GrGAPDH* 基因作为内参（张晓东等，2015），设计特异引物（表 3），以 2 × T5 Fast qPCR Mix（SYBR Green I，购自 TSINGKE 公司，生产批号：TSE202））进行扩增，反应条件：预变性阶段（95 ℃，1 min）；循环阶段（95 ℃，10 s；60 ℃，5 s；72 ℃，10 s）；溶解阶段（95 ℃，15 s；60 ℃，1 min；95 ℃，15 s），在循环阶段 72 ℃时采集荧光信号，采用比较 CT 值的“$2^{-\Delta\Delta CT}$”的方法进行定量数据的分析处理，结果用 GraphPad Prism 5.0 软件作图表示。

表 3 *GrHDR* 基因和内参基因的引物序列

Table 3 Primer sequences of *GrHDR* gene and reference gene

引物名称 Name of primer	引物序列（5’-3’） Primer sequence
HDR-F	CGTTGCCGGAGTCGAAGATA
HDR-R	CGAGTCAACACTCACAGACGA
GAPDH-F	TGTTCGGCGTTAGAAACCCA
GAPDH-R	CTTCGCACCTCCCTTGATGT

1.2.5 不同光照条件下 *GrHDR* 基因的组织表达分析

采用数字式照度计（型号：GM1040，购自深圳聚茂源科技有限公司）测得全光、一层及二层遮荫网下的对应光照强度为（107 248±7 938） lx，（31 196±3 406） lx，（10 217±804） lx，分别表示为 100%、30%、10%全光光照，其他栽培措施保持一致，经过一年的光照处理，取滇龙胆植株的根、茎、叶，分别进行荧光定量 PCR。具体方法及内参基因的选择参照 1.2.4，进行 *GrHDR* 基因的组织表达分析。

1.3 龙胆苦苷含量的测定

1.3.1 试剂与仪器

对照品龙胆苦苷（批号：S2220010）购自上海安谱实验科技股份有限公司；甲醇为色谱纯，其他试剂均为分析纯；所用仪器 Agilent Technologies 1290 infinity II 高效液相色谱仪购自安捷伦科技（中国）有限公司、AS10200 超声波清洗机购自天津奥特赛恩斯仪器有限公司等。

1.3.2 材料与前处理

将实验材料在 50 ℃条件下烘干磨碎，过 40 目筛备用。称取样品粉末 0.25 g，置于 50 mL 锥形瓶中，加入甲醇 10 mL，称定质量；在 40 ℃条件下超声（300 w，40 kHz）提取 30 min，冷却后继续称重，用甲醇补足减少的重量；然后摇匀，取试液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后作为供试品。

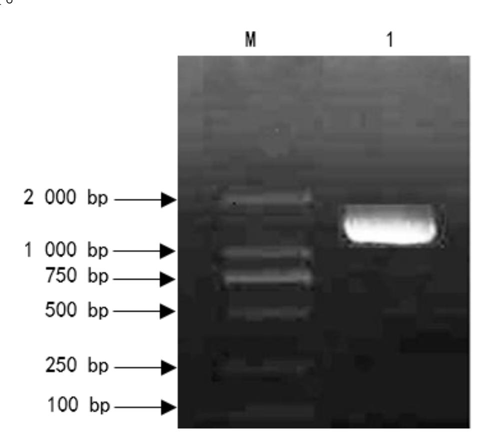
1.3.3 龙胆苦苷 HPLC 检测的色谱条件

InertSustain C_{18} 色谱柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm），柱温 30 ℃，检测波长为 241 nm，流速为 1 mL • min^{-1}，进样量为 20 μL。流动相与洗脱条件：流动相 A 相为甲醇，B 相为 0.1%甲酸水；梯度洗脱：0-15 min，7%-35%A；15-32 min，35%-90%A；36-42 min，10%-93%B。

2. 结果与分析

2.1 *GrHDR* 基因 ORF 序列的克隆

从幼叶提取总 RNA 后，使用分光光度计测得浓度为 612.4 μg • mL^{-1}，$A_{260/280}$ 为 1.82，纯度较高，置于-80℃冰箱中保存备用。反转录后，以滇龙胆叶片 cDNA 为模板，使用特异性引物并扩增出约 1 500 bp 的片段（图 1）。通过 TA 克隆的方法获得质粒，酶切检测正确后，送至 TSINGKE 公司测序，表明 *GrHDR* 基因（GenBank 登录号： KJ917165.1）ORF 序列长 1 398 bp，编码 465 个氨基酸。



M. DNA Maker DL2000；**1.** PCR 产物。

N. DNA Maker DL2000; **1.** PCR products.

图 1 滇龙胆 *GrHDR* 基因电泳结果

Fig. 1 Gel electrophoresis results of *GrHDR* gene from *Gentiana rigescens*

2.2 GrHDR 蛋白预测与分析

2.2.1 GrHDR 蛋白的理化性质

使用 ExPASy 蛋白质组学服务器的 Protparam 分析 GrHDR 蛋白的理化性质，结果显示，该蛋白的不稳定系数为 30.34，说明该蛋白是稳定的；分子质量是 52 281.25 Da；理论等电点是 5.32；脂肪系数是 77.98；亲水性的平均值为-0.427，为亲水蛋白。

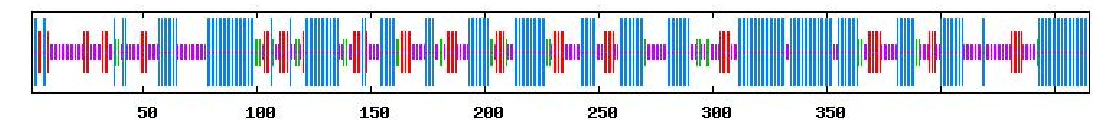
表 4 GrHDR 蛋白的理化性质预测

Table 4 Physicochemical properties of the putative protein

Protein characteristic	GrHDR
氨基酸数 Number of amino acids	465
分子式 Formula	$C_{2324}H_{3642}N_{614}O_{720}S_{18}$
分子质量 Molecular weight	52 281.25 Da
等电点 Isoelectric point (pI)	5.32
带正电的残基（精氨酸+赖氨酸） Positively charged residues (Arg+Lys)	57
带负电的残基（天冬氨酸+谷氨酸） Negatively charged residues (Asp+Glu)	71
不稳定系数 Instability index	30.34
脂肪系数 Aliphatic index	77.98
亲水性的平均值 Grand average of hydropathicity	-0.427

2.2.2 GrHDR 蛋白的结构预测

利用 SOPMA 网站在线预测 GrHDR 蛋白的二级结构（图 2），结果显示在 GrHDR 蛋白中，α-螺旋，β-转角、无规卷曲、延伸链的百分比分别为 45.16%、6.24%、33.98%和 14.62%。使用 EMBL-EBI 数据库下 pfam 程序中对 GrHDR 蛋白进行结构域预测，结果显示该蛋白属于 LYTB（即 1-hydroxy- 2-methyl-2-（*E*）-butenyl-4-diphosphate reductase，HDR）蛋白家族。运用 SignalP 5.0 进行信号肽序列预测，结果显示 GrHDR 蛋白的信号肽的可能性为 0.0006，是非分泌蛋白。运用 ChloroP 1.1 Server 在线预测 GrHDR 蛋白转运肽长度，结果显示该蛋白含有转运肽序列为 35 个氨基酸残基。运用 TMHMM 2.0server 预测 GrHDR 蛋白序列的跨膜结构域，结果显示该蛋白无跨膜螺旋。运用 predict protein 预测 GrHDR 蛋白的亚细胞定位，结果显示该蛋白定位在叶绿体，可信度为 71%；使用 Softberry 数据库 ProtComp 9.0 软件预测结果显示 GrHDR 蛋白亚细胞定位结果为叶绿体，结果得分为 9.3；不同的预测工具预测结果是相同的。



蓝色代表α-螺旋，绿色代表β-转角，黄色代表无规卷曲，红色代表延伸链。

Blue represents α-helix, green represents β-turn, yellow represents random curl, and red represents extended chain.

图 2 GrHDR 蛋白序列的二级结构预测结果

Fig. 2　Secondary structure prediction results of GrHDR protein sequence

2.2.3 三维结构的预测

运用 SWISS-MODEL 在线软件自动模式预测 GrHDR 蛋白的三级结构，所构建模型如图 3 所示。GMQE（全局模型质量估计）是一种质量估计，其值位于 0-1 之间，反映了使用该对齐和模板构建的模型的预期准确度以及目标的覆盖范围，数字越接近 1 表示可靠性越高，该模型的 GMQE 值为 0.42，可靠性一般。以超耐热菌 *Aquifex aeolicus*4-羟基-3-甲基丁-2-烯基二磷酸还原酶（SMTL ID：3dnf.1）为模板，在第 80-297 氨基酸处建模，序列相似度为 36.86%。

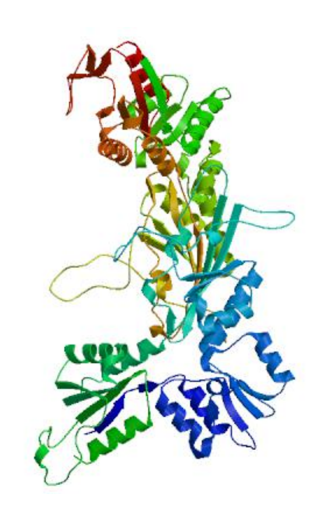
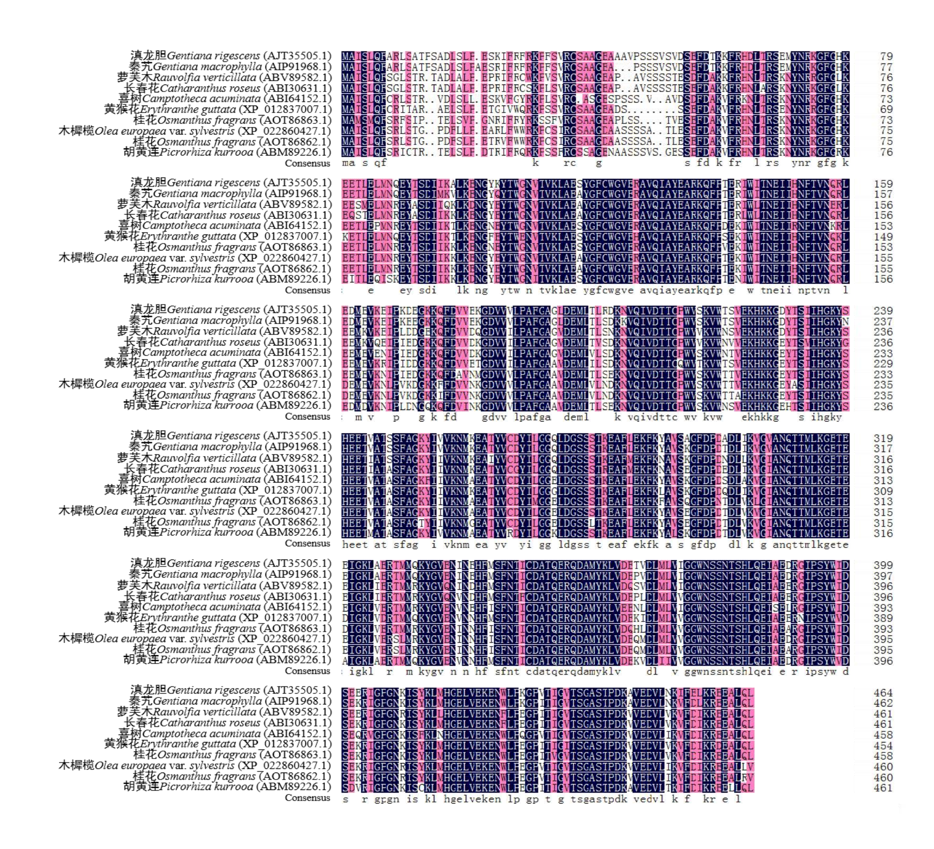


图 3 GrHDR 蛋白的三级结构模型预测结果

Fig. 3　Prediction results of the tertiary structure model of the GrHDR protein

2.3 多序列比对与系统发育分析

使用 NCBI 网站的 BLASTp 程序对 GrHDR 蛋白进行序列比对，结果表明滇龙胆 GrHDR 蛋白与同属植物秦艽 GmHDR 蛋白相似度最高（95.71%），其次是萝芙木（*Rauvolfia verticillata*）的 RvHDR 蛋白（84.09%），与长春花（*Catharanthus roseus*）、喜树（*Camptotheca acuminata*）、桂花（*Osmanthus fragrans*）、木樨榄（*Olea europaea* var. *sylvestris*）、黄猴花（*Erythranthe guttata*）、胡黄连（*Picrorhiza kurrooa*）等植物的 HDR 蛋白序列相似性也较高。运用 DNAMAN 对以上序列进行多序列比对，结果如图 4 所示。运用 MEGA 6.0 对以上序列与 GrHDR 蛋白序列进行系统发育分析，结果（图 5）滇龙胆 GrHDR 蛋白与秦艽 GmHDR 蛋白位于同一分支，表明它们的亲缘关系最近。



黑色部分表示相似性=100%，红色部分表示相似性在 75%-100%之间（不包括 100%），白色部分表示相似性<75%。

The black part indicates similarity = 100%, the red part indicates similarity between 75% - 100% (excluding 100%), and the colorless part indicates similarity <75%.

图 4 GrHDR 蛋白与其它植物 HDR 蛋白的多序列比对结果

Fig. 4 Multiple sequence alignment of GrHDR protein with other plant HDR proteins

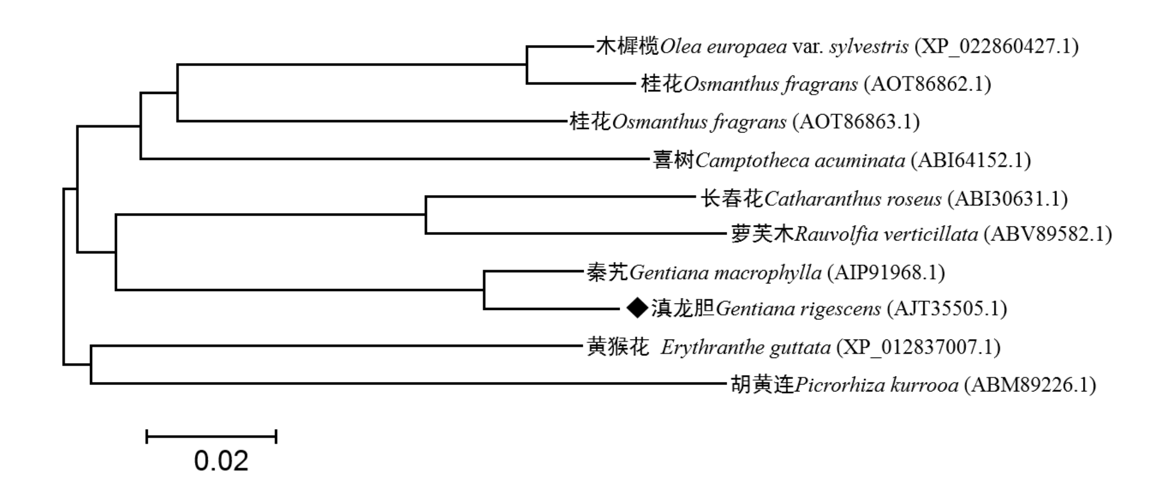
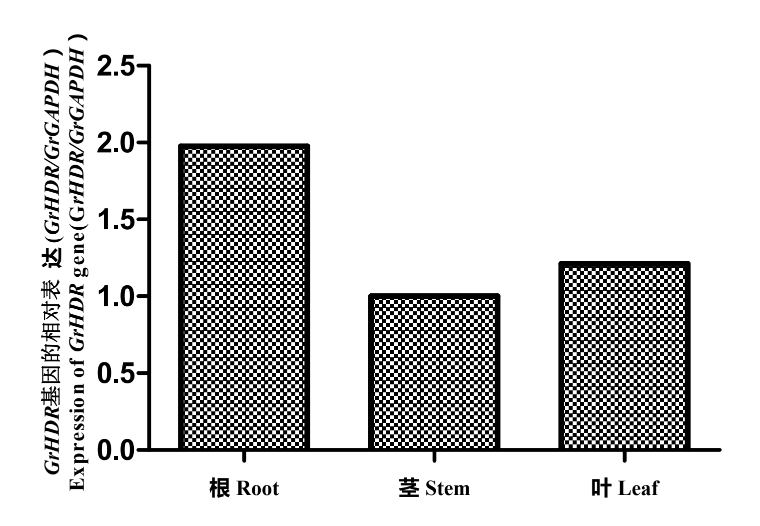


图 5 GrHDR 蛋白与其它植物 HDR 蛋白的系统发育树构建结果

Fig. 5 Phylogenetic tree construction results of GrHDR protein and other plant HDR proteins

2.4 滇龙胆 *GrHDR* 基因的组织特异性表达分析

取一年生滇龙胆的根、茎和叶，提取总 RNA 后，反转录成 cDNA，通过 qRT-PCR 分析 *GrHDR* 基因在不同组织中的表达情况。结果表明 *GrHDR* 基因在根中的表达量最高，其次是叶和茎（图 6）。



茎中的表达量设为 1。

Suppose the expression in the stem is 1.

图 6 *GrHDR* 基因在根、茎、叶中的相对表达

Fig. 6 Relative expression of *GrHDR* gene in root, stem and leaf

2.5 不同光照条件下 *GrHDR* 基因的组织特异性表达分析

在不同的光照条件下，*GrHDR* 基因在不同组织中的表达量有很大差异。100%全光光照下，*GrHDR* 基因的表达量为：叶 ＞ 茎 ＞ 根，且叶中的表达量是根的 2.59 倍。在 30%全光光照下，*GrHDR* 基因的表达量为：根 ＞ 叶 ＞ 茎，且叶中的表达量是根的 0.70 倍。在 10%全光光照下，*GrHDR* 基因的表达量为：叶 ＞ 根 ＞ 茎，且叶中的表达量是根的 2.75 倍。结果表明，在 30%全光光照下，*GrHDR* 基因在作为药用部位的根的表达量最高。

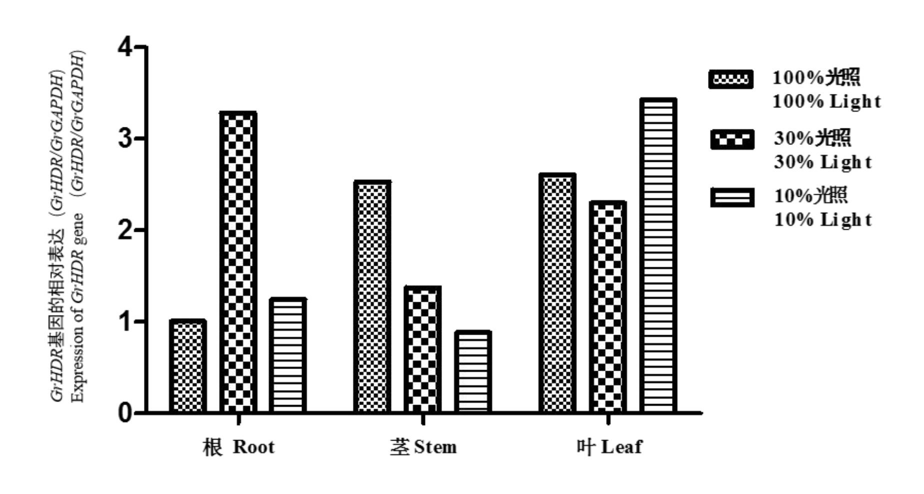


图 7 不同光照条件下 *GrHDR* 基因的表达量分析结果

Fig. 7 Results of expression of *GrHDR* gene under different light conditions

2.6 龙胆苦苷含量分析

龙胆苦苷在 0.001-0.500 mg・mL^{-1} 范围内线性关系良好，回归方程为 y = 24 960x + 28.671（r = 0.9993）。根据公式计算求得对应龙胆苦苷含量，以质量分数表示，结果如图 8 所示，根及叶中龙胆苦苷含量多数大于 1.5%，符合药典中关于滇龙胆龙胆苦苷含量的规定；此外，在不同光照条件下，龙胆苦苷含量均表现为：根 ＞ 叶 ＞ 茎，与龙胆裂环烯醚萜类活性成分积累结果一致（赵志莲，2016）；在药用部位根中，100%全光照时龙胆苦苷含量最多，达 7.141%，分别是 30%、10%全光光照条件下龙胆苦苷含量的 2.25 倍、2.26 倍。

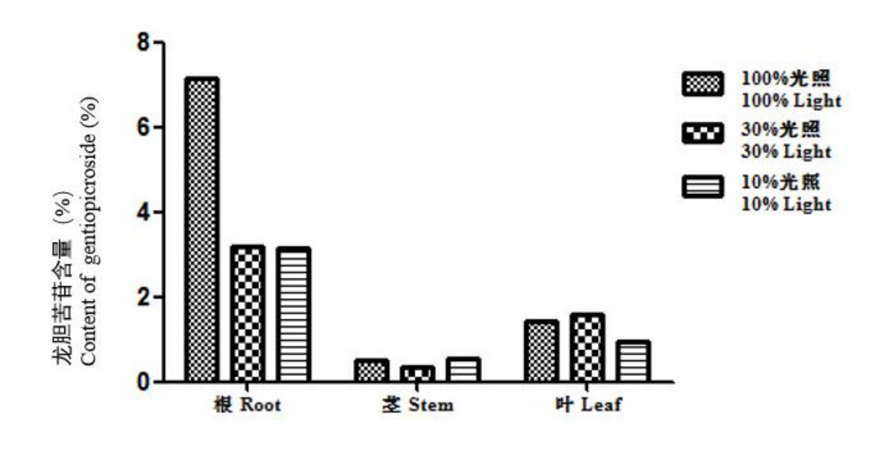


图 8 不同光照条件下滇龙胆不同组织龙胆苦苷含量分析结果

Fig. 8 Results of gentiopicroside content in different tissues of *G. rigescens* under different light conditions

3 讨论

MEP 途径的流量决定了终产物的产量，酶反应的速率又决定了代谢途径的流量（张海晨等，2016）。尽管已在细菌和植物中鉴定了 MEP 途径的所有基因，但仍需大量工作来分析相应酶基因在控制中间体通量中的作用(Rodríguez-Concepción & Boronat，2002)。MEP 途径的最后一步由 HDR（以前称为 LytB 或 IspH）催化，其将 HMBPP 转化为 IPP 或 DMAPP，对萜类物质的合成具有重要的调控作用。过表达 *HDR* 基因会催化 IPP 和 DMAPP 以 5:1 至 6:1 的比例合成青蒿素(Peng et al.，2011)。*HDR* 基因在喜树(Wang et al.，2008)、铁皮石斛（吴秋菊等，2015）等植物的不同组织中的表达量存在很大差异，且在同种植物不同组织中萜类代谢物的含量也存在类似差异(Wang et al.，2008)。

在本研究中，我们从滇龙胆中克隆了 *GrHDR* 基因，并使用生物信息学方法对其编码蛋白进行了分析。结果表明，*GrHDR* 基因的 ORF 长度为 1 398 bp，编码 465 个氨基酸，属于 LYTB 蛋白家族成员；GrHDR 蛋白定位于叶绿体，符合 MEP 途径定位于质体的事实。GrHDR 蛋白序列与同属植物秦艽的相似度最高，且系统发育分析显示它们位于同一进化支。

遮荫会影响植物基因表达及次生代谢产物的积累，如不同遮荫处理下茶树中咖啡碱的含量呈现先下降后上升的趋势，而咖啡碱代谢途径中的关键基因（如 *TCS1*）的表达呈现先升高后下降的趋势（顾辰辰等，2017）。本研究通过三种遮荫条件处理滇龙胆植株，使用荧光定量法测定 *GrHDR* 基因的表达量，并通过高效液相色谱仪测定龙胆苦苷含量。结果表明，*GrHDR* 基因在滇龙胆的不同组织中均有表达，不同光照条件下该基因的表达有很大差异，

且 *GrHDR* 基因表达规律与对应龙胆苦苷积累规律不完全一致。其中，图 6 的实验材料来自30%全光光照条件，其与图 7 中相同光照条件下的基因表达量都为：根 ＞ 叶 ＞ 茎，但 9 月份（图 7）的样品较 5 月份（图 6）的样品表达量有所增加。由此可推测，不同光照时长会对 *GrHDR* 基因的表达量产生影响，进一步还可开展不同生长年限 *GrHDR* 基因表达量变化的研究。此外，不同光照条件下龙胆苦苷含量积累规律一致，但一层和二层遮荫下根的龙胆苦苷含量较低，因此可推测，滇龙胆苗期栽培时不需要遮荫。关于 *GrHDR* 基因表达与龙胆苦苷含量的具体关系，以 100%全光光照条件为例，一年生植株龙胆苦苷含量积累为：根 ＞ 叶 ＞ 茎，而对应 *GrHDR* 基因表达量为：叶 ＞ 茎 ＞ 根。这一结果可能由于龙胆苦苷是在叶中合成，后通过茎运输至根中积累与储存（赵志莲，2016）。另外，龙胆苦苷合成途径包含一系列基因，仅通过 *GrHDR* 基因的表达无法得出其与龙胆苦苷含量之间的明确关系。

本研究对 *GrHDR* 基因进行了序列分析及表达量的分析，有助于在分子生物学水平上揭示龙胆苦苷的生物合成，为龙胆苦苷的代谢工程提供候选基因，且丰富了 *GrHDR* 基因的表达规律，并为以后 *GrHDR* 基因功能分析提供了参考。此外，通过不同光照条件下 *GrHDR* 的表达以及对应龙胆苦苷含量的研究，为滇龙胆栽培的生产实践提供了依据。下一步可通过过表达 *GrHDR* 基因及互补实验等深入研究该基因的功能，以及对该基因表达与龙胆苦苷含量之间的关系作进一步的探讨。

参考文献：

BOTELLA - PAVÍA P, BESUMBES Ó, PHILLIPS MA, et al., 2004. Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxy methyl butenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors[J]. Plant J, 40(2): 188-199.

CEN W, KONG WW, ZHENG P, et al., 2015. Cloning and expression analysis of 1-hydroxy -2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphate reductase gene (*GmHDR*) from *Gentiana macrophylla*[J]. Guihaia, 35(5): 755-760. [岑文，孔维维，郑鹏，等，2015. 秦艽 1-羟基-2-甲基-2-(*E*)-丁烯基-4-焦磷酸还原酶基因（*GmHDR*）的克隆和表达分析[J]. 广西植物，35(5): 755-760.]

Editorial Board of Flora of China, 1988. Flora Reipublicae Popularis Sinicae[M]. Beijing: Science Press, 62: 100. [中国科学院中国植物志编辑委员会，1988. 中国植物志 [M]. 北京：科学出版社，62: 100.]

EL-SAYED M, VERPOORTE R. 2007. *Catharanthus* terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation[J]. Phytochem Rev, 6(2-3): 277-305.

ENDANGERED SPECIES SCIENTIFIC COMMISSION, P. R. C, 2012. List of national key protected wild medicinal Species[Z]. Beijing. [中华人民共和国濒危物种科学委员会，2012. 国家重点保护野生药材物种名录[Z]. 北京。]

GU CC, WANG RX, JIANG LN, et al., 2017. Short-term shading influencing the biosynthesis of caffeine, theanine and catechins in tea (*Camellia sinensis*)[J]. J Anhui Agric Univ, 44(1): 1-6. [顾辰辰，王荣秀，江丽娜，等，2017. 短期遮荫对茶树嘌呤碱、氨基酸和儿茶素生物合成的影响[J]. 安徽农业大学学报，44(1): 1-6.]

HUANG JZ, CHENG TC, WEN PJ, et al., 2009. Molecular characterization of the *Oncidium* orchid HDR gene encoding 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphate reductase, the last step of the methylerythritol phosphate pathway[J]. Plant Cell Rep, 28(10): 1475-1486.

KIM YB, KIM SM, KANG MK, et al., 2009. Regulation of resin acid synthesis in *Pinus densiflora* by differential transcription of genes encoding multiple 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase and 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphate reductase genes[J]. Tree Physiol, 29(5): 737-749.

LIANG J, YI T, YE Y, 2016. Effects of shading on photosynthetic characteristics and saponin content of *Paris polyphylla*[J]. J Jiangsu Agric Sci, 44 (4): 265-267. [梁娟，易涛，叶漪，2016. 遮荫对七叶一枝花光合特性及皂苷含量的影响[J]. 江苏农业科学，44(4): 265-267.]

LV HZ, ZHANG X, LIAO BS, et al., 2015. Cloning and analysis of 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphate reductase genes *HsHDR1* and *HsHDR2* in *Huperzia serrate*[J]. Acta Pharm Sin B, 5(6): 583-589.

MIETTINEN K, DONG L, NAVROT N, et al., 2014. The seco-iridoid pathway from

Catharanthus roseus[J]. Nat Comm, 5: 3606.

NATIONAL PHARMACOPOEIA COMMITTEE, 2015. Chinese Pharmacopoeia[M]. Part I. Beijing: China Pharmacopoeia Science and Technology Press: 96. [国家药典委员会，2015. 中华人民共和国药典：一部[M]. 北京：化学工业出版社：96.]

PENG MF, CHEN M, CHEN R, et al., 2011. The last gene involved in the MEP pathway of *Artemisia annua*: Cloning and characterization and functional identification[J]. J Med Plants Res, 5(2): 223-230.

Rodríguez-Concepción M, Boronat A, 2002. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics[J]. Plant Physiol, 130(3): 1079-1089.

WANG Q, PI Y, HOU R, et al., 2008. Molecular cloning and characterization of 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphate reductase (*CaHDR*) from *Camptotheca acuminata* and its functional identification in *Escherichia coli*[J]. BMB Rep, 41(2): 112-118.

WU QJ, WU MJ, WANG X, et al., 2015. Cloning and expression analysis of 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphatereductase gene in *Dendrobium officinale*[J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 46(3): 405-411. [吴秋菊，武梅娟，王翔，等，2015. 铁皮石斛 1-羟基-2-甲基-2-（*E*）-丁烯基-4-焦磷酸还原酶基因的克隆与表达分析[J]. 中草药，46(3): 405-411.]

YANG WX, ZHOU L, GENG HL, et al., 2003. A survey of study of chemical components of medicinal plant of Gentianaceae[J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 23(12): 2235 -2240. [杨维霞，周乐，耿会玲，等，2003. 龙胆科药用植物化学成分的研究现状[J]. 西北植物学报，23(12): 2235-2240.]

ZHANG CY, 2018. Effects of cultivation measures on growth and secondary metabolites contentof *Bletilla striata*[D]. Northwest A&F Univ. [张长煜，2018. 栽培措施对白及生长和次生代谢物含量的影响[D]. 西北农林科技大学。]

ZHANG HC, LI CX, WANG YZ, et al., 2016. Cloning and expression analysis of gene encoding 1-deoxy-dxylulose 5-phosphate synthase in *Gentiana rigescens*[J]. Biotechnol Bull, 32(4): 128-136. [张海晨，李彩霞，王元忠，等，2016. 滇龙胆 1-脱氧-D-木酮糖 5-磷酸合酶基因的克隆与表达分析[J]. 生物技术通报，32(4): 128-136.]

ZHANG W, WANG YL, LIN J, et al., 2008. Transformation of *Ginkgo biloba* with 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphate reductase gene[J]. J Fudan Univ: Nat Sci Ed, 47(5): 598-603. [张雯，王玉亮，林娟，等，2008. 银杏 1-羟基-2-甲基-2-(*E*)-丁烯基-4-焦磷酸还原酶基因(*hdr*)转化银杏的研究[J]. 复旦学报(自然科学版)，47(5): 598-603.]

ZHANG XD, ALLAN AC, LI CX, et al., 2015. *De Novo* Assembly and characterization of the transcriptome of the Chinese medicinal herb, *Gentiana rigescens*[J]. Int J Mol Sci, 16(5): 11550-11573.

ZHANG XD, LI CX, ZHAO J, et al., 2015. Cloning and expression analysis of mevalonate kinase gene in *Gentiana rigescens*[J]. Life Sci Res, 19(3): 196-202. [张晓东，李彩霞，赵静，等，2015. 滇龙胆甲羟戊酸激酶基因的克隆与表达分析[J]. 生命科学研究，19(3): 196-202.]

ZHANG XD, LI CX, WANG YZ, et al., 2019. Cloning and expression analysis of mevalonate kinase gene in *Gentiana rigescens*[J]. J Jiangsu Agric Sci, 47(17): 76-81. [张晓东，李彩霞，王元忠，等，2019. 滇龙胆草 7-脱氧番木鳖酸-7-羟化酶基因的克隆与表达分析[J]. 江苏农业科学，47(17): 76-81.]

ZHAO ZL, ZHANG L, LIU WH, et al., 2016. Accumulation rule of active secoiridoid in the same population *Gentiana rigescens* Franch[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 27(9): 2073-2075. [赵志莲，张琳，刘卫红，等，2016. 滇龙胆裂环烯醚萜类活性成分积累规律的研究[J]. 时珍国医国药，27(9): 2073-2075.]